絶縁油中 PCB 迅速判定キット「PCB-ELISA-KIT」取扱説明書

■本キットの構成

No.	品　　名	容　量	数　量	保存温度条件
①	PCB抗原固相化マイクロプレート	96 well	1 枚	2～8℃
②	一次反応液	15 mL	1本	2～8℃
③	一次抗体粉末	6 mL用	1本	2～8℃
④	標識二次抗体粉末	14 mL用	1 本	2～8℃
⑤	二次抗体溶解液	14 mL	1 本	2～8℃
⑥	20倍濃縮洗浄液	50 mL	1 本	2～8℃
⑦	発色液	15 mL	1 本	2～8℃
⑧	発色停止液	15 mL	1 本	2～8℃
⑨	プレートシール	–	2 枚	–
⑩	使用説明書(本書)	–	1 部	–

■本キットの取り扱い

以下の取り扱い上の注意点を遵守してください。

1） キットは、冷蔵庫(2～8℃)にて保管してください。
2） キットは、使用前に 30 分程度放置して室温に戻してから使用してください。
3） 異なるキットの試薬を組み合わせて使用しないでください。
4） キットの有効期間は、未開封の状態で製造より 2 年間で、有効期間の過ぎたものは使用しないでください。
5） キットを保管する場合は、保存場所、保存方法、汚染の配慮、温度及び湿度の情報を記録し、保存してください。
6） 測定は、「絶縁油中の微量 PCB に関する簡易測定マニュアル(第２版)」（環境省・平成 22 年 6 月 30 日）の内容に従ってください。

その他、ご不明な点は下記までお問い合わせください。また、最新情報・更新情報は、下記ホームページに掲載いたします。

株式会社アース・ソリューション　事業本部（担当：　川原）
E-mail:　info@earthsolution.co.jp　TEL: 03-5623-4515　FAX: 03-5623-4516
〒103-0014 東京都中央区日本橋蛎殻町 1-3-5 共同ビル(兜町)3 階
URL:　http://www.earthsolution.co.jp

2011(H23).08.16 更新

【測定マニュアル】

本内容は、平成 22 年 6 月に環境省が発表した「絶縁油中の微量 PCB に関する簡易測定法マニュアル第 2 版（以下、環境省マニュアル）」をもとに次のように作成しています。
・環境省マニュアル中で本キットに品番があるものは、その品番を「」付きで挿入
・本品使用における解説として器具の例、操作の注意事項、補足などを実線で囲い挿入
・環境省マニュアルにおける巻末の留意事項を該当箇所に再褐
・環境マニュアルにおけるタイプミスなどを修正　など

「加熱多層シリカゲルカラム/アルミナカラム/間接競合酵素免疫測定（ELISA 法）」

(1) 概要（適用範囲）

ここに定める方法は、前処理に多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用してクリーンアップを行い、測定に抗 PCB モノクローナル抗体と抗原固相化プレートを用いた間接競合酵素免疫測定法（ELISA）を利用して行うもので、絶縁油中の PCB 濃度の迅速判定について適用する。

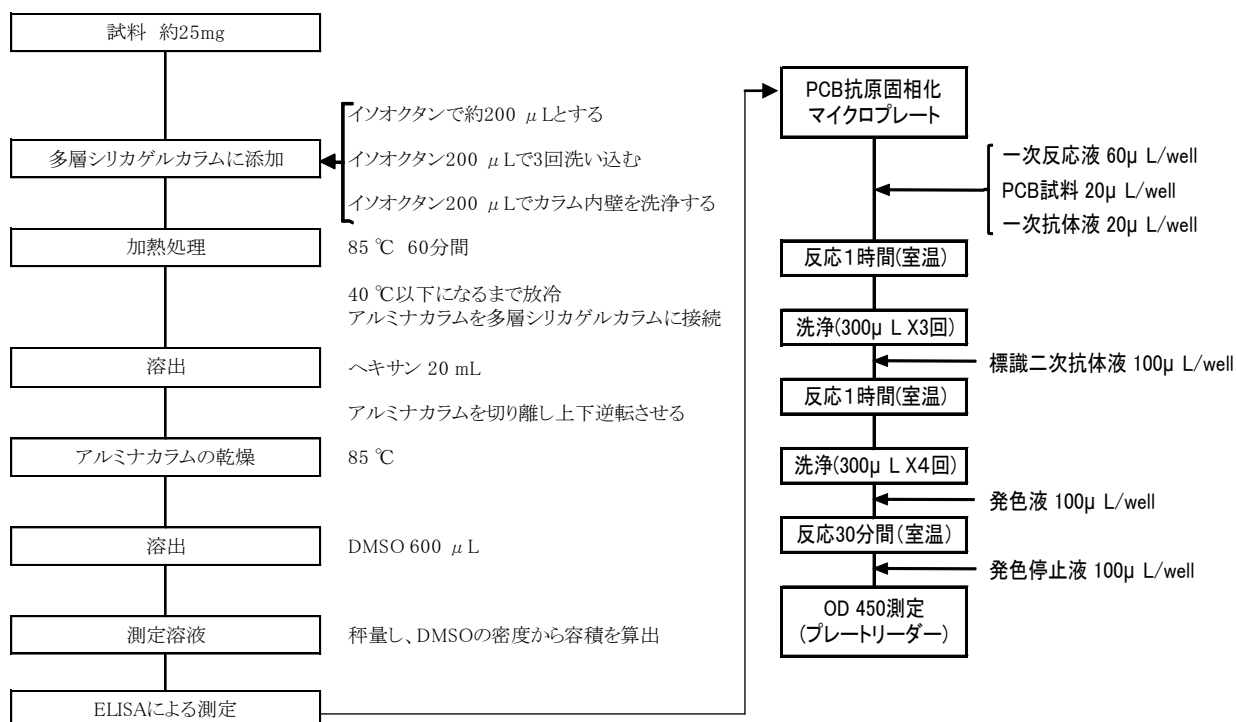
(2) 測定の概要

1) 測定の概要

試料を加熱固相カラム（多層シリカゲルカラムおよびアルミナカラム）を使用しクリーンアップし、測定には抗 PCB モノクローナル抗体と抗原固相化プレートを用いた間接競合酵素免疫測定法（ELISA）を利用して行う方法である。

2)　測定操作フロー

測定フローを図 1 に示す。なお、フロー図に記載された条件は一例である。

図１　測定フロー

（3）試薬、器具及び装置

1）試薬

測定に使用する試薬は次による。これらの試薬は、空試験などによって測定に支障のないことを確認しておく。又、記述以外の試薬を使用する場合も同等の試験を行い、測定に支障のないことを確認しておく。

a. **ヘキサン**　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

b. **ジメチルスルホキシド(DMSO)**　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

c. **イソオクタン**　JIS K9703 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

d. **多層シリカゲルカラム及びアルミナカラム**　44%硫酸被覆シリカゲル 4.7g と金属硝酸塩（20%硝酸銀）被覆シリカゲル 0.59g 又は 44%硫酸被覆シリカゲル 3.8g と金属硝酸塩（15%硝酸銀 15%硝酸銅）被覆シリカゲル 1.4g を充填したカラム、並びに、活性化を施したアルミナ 0.6g を充填したカラム。これらのカラムは、市販されている。これらのカラムは、洗浄された状態で入手できるので、特に使用前の洗浄は行わなくて良い。

e. **水**　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水又は同等の品質のもの。

f. **検量線作成用標準品**　カネクロール標準品、KC-400 標準物質。

2）器具

測定に使用する器具は次による。これらの器具は、空試験などによって測定に支障のないことを確認しておく。

a. **酵素免疫測定キット**※1）　抗 PCB モノクローナル抗体と抗原固相化プレートには PCB 誘導体が固相化されたものを使用する。

b. **マイクロチューブ**　容量が約 1.5 mL のもの。

c. **マイクロピペット**　JIS K0970 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

d. **マルチチャンネルピペット**　8 チャンネルのもの。

e. **マイクロピペット用チップ**　JIS K0970 に規定するもの、又は同等の品質のもの。

f. **96 穴 PP プレートＵ底**　1 ウェルの容量が 300μL 以上のもの。

3）装置

測定に使用する装置は次による。

a. **多層シリカゲルカラム加熱用ヒーター**　温度調節機能を備えたもので、多層シリカゲルカラム中で試料が浸透している領域を目的温度で持続的に加熱できるもの。

b. **アルミナカラム加熱用ヒーター**　温度調節機能を備えたもので、アルミナカラムに充填したアルミナを目的温度で持続的に加熱できるもの。

c. **プレートリーダー 分光光度計**　波長 450 nm における吸光度を精度良く検出できる装置。

d. **プレートウォッシャー**　プレートのウェル中の溶液の排出、ウェル中への洗浄液の供給を正確にできる装置。

（4）前処理

補足 前処理工程の自動化装置・カラムの取り扱いに関しては販売先の最新情報に従ってください。

1）試料の調製

試料約 25 mg[※2), ※3)] をマイクロチューブに秤量し、イソオクタンを加えて全量を約 200μL の均一溶液とする[※4)]。

※２　芳香族系化合物が主体の絶縁油（JIS2 種，4 種，5 種，DOP）以外の JIS1 種，JIS3 種，JIS6 種，JIS7 種の試料では約 100mg まで増量することも可能である。

※３　秤量に用いる天秤は、0.1 mgまで測定できるものを使用すること。

※４　加熱多層シリカゲルカラム/アルミナカラムを前処理に用いる簡易定量法において使用されるクリーンアップスパイクを添加することは可能である。

2）加熱多層カラム前処理

a. 試料調製の操作で調製した溶液を多層シリカゲルカラム[※5)]に移し入れ、マイクロチューブをイソオクタン 200μL で 3 回洗い込んだ後、イソオクタン 200μL にて多層シリカゲルカラムの内壁を洗浄する[※6)]。

※５　前処理後の多層シリカゲルカラムについては、測定データの信頼性が確認されるまで現物保存もしくは写真を撮り保存すること。試料の精製度の確認は、試料の精製度確認のための測定を行い判断することができる。精製度が不十分である場合、使用した多層シリカゲルカラムの着色状態などから原因を明らかにした上で試料を減量する等して前処理をやり直す。

※６　多層シリカゲルカラムに移し入れる溶液及び洗浄液量は合計でほぼ 1 mL とする。この液量以下あるいは以上であると精製効率が低下することがある。

b. 多層シリカゲルカラムに移し入れた溶液が展開している部分[※7)] を多層シリカゲルカラム加熱用ヒーターで 85 ℃にて 60 分間[※8)] 加熱した後、多層シリカゲルカラムを 40 ℃以下になるまで放冷する。

※７　この部分以外を加熱すると精製効率が低下及び PCB の回収率が低下することがある。

※８　加熱温度は 60 から 90 ℃の範囲で、加熱時間は任意の範囲で変化させても良いが、85 ℃にて 60 分間加熱する場合と同等の精製効果が得られること。

c. アルミナカラムを多層シリカゲルカラム下端に連結した後、ヘキサン 20 mL[※9)] を流下させる[※10)]。

※９　ヘキサンの液量を変化させても良いが、PCB の回収率が確保されることを確認すること。

※１０　着色した部分が片寄ったりしているなど、カラムクロマトの展開が乱れている場合は、やり直すこと。

d. アルミナカラムを多層シリカゲルカラムと切り離し、アルミナカラム加熱用ヒーターで 85 ℃[※11)]に加熱しながら清浄な空気もしくは窒素をアルミナカラムに吹き込み、アルミナカラムに残留しているヘキサンを乾燥する。

※１１　加熱温度を変化させても良いが、PCB の回収率が確保されることを確認すること。

e. 上下逆転させたアルミナカラムを 85 ℃に維持しながら DMSO 600μL[※12), ※13)] を

添加し、アルミナカラム下端にマイクロチューブを置いて、約 200 から 300μL の溶出液を得る。秤量し、風袋との差分を重量測定し、DMSO の密度から容積を求め測定溶液とする。

※１２　DMSO の液量を変化させても良いが、PCB の回収率と測定における感度が確保されることを確認すること。

※１３　DMSO の代わりにトルエン 600μL を用いても構わない。その場合、溶出したトルエンの一定量を DMSO に転溶して測定液とすること。

3)標準溶液の調製

DMSO を用いて KC400 標準物質を希釈し、50、10、5、2、1、0.2ng/mL 濃度になるようにそれぞれガラスバイアルに調製する。順に STD1、STD2、STD3、STD4、STD5、STD6 とする。

4）試料希釈溶液の調製

DMSO を用いて前処理試料の希釈溶液（約 10μg/μL）をマイクロチューブに調製する。約 25mg の絶縁油を前処理し約 250μL の DMSO 溶液として調製した前処理試料は、DMSO を用いて 10 倍希釈する。

5)濃度既知の参照試料溶液の調製

前処理に使用する多層シリカゲルカラムおよびアルミナカラムに充填する薬剤の製造ロット毎に調製する。0.5mg/kg の絶縁油試料を前処理した後、DMSO を用いて希釈溶液（約 10μg/μL）をマイクロチューブに調製する。約 25mg の絶縁油を前処理し約 250μL の DMSO 溶液として調製した試料は、DMSO を用いて 10 倍希釈する

（5）測定

1）測定条件

検量線作成用標準溶液及び濃度既知の参照試料溶液の測定は、プレート毎に前処理済み試料希釈用液の測定と同時に行う。図 2 に示すように、最多 40 検体の試料に対して、濃度既知の参照試料は 1 回の頻度で行う。

検量線作成用標準溶液、前処理済み試料希釈用液および濃度既知の参照試料溶液の測定は同一プレート上で 2 回ずつ（n=2）行う。

手順解説：　洗浄液の調整（事前作業 1）
「⑥20 倍濃縮洗浄液」と精製水を 1：19 の割合で混合（例：25ml の 20 倍濃縮洗浄液に 475ml の精製水を添加）し、「洗浄液」を調製します。
・分割使用の場合は、1 回の測定に必要な量だけ分取して使用してください（1well あたり約 5mL（1 ﾌﾟﾚｰﾄあたり約 500mL）を調製の目安としてください。
・20 倍濃縮洗浄液は、実際の必要量より多めに添付されています。
・環境省マニュアルでは、未反応物の除去として一次抗原抗体反応中の作業として記載されていますが、本手順を推奨します。

手順解説： PCB 抗原固相化マイクロプレートの前洗浄処理（事前作業 2）
「①PCB 抗原固相化マイクロプレート」の各 well に、「洗浄液」を約 300～400μL/well を添加し 10 分間以上かけて被覆層を溶かします。洗浄液を捨て、再び「洗浄液」300～400μL/well を添加し、洗浄液を捨てます。裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で軽くたたいて（タッピング）、洗浄液をよく除去してください。
・洗浄液の添加はピペット又は洗浄機を使用し、除去にはプレート洗浄機のアスピレーター機能を用いるか、マイクロプレートを転倒して液を切ることにより行います。
・マイクロプレートには安定性保持のためにショ糖を等含む安定化剤が被覆されています。反応を行う前に洗浄液で被覆を溶かすことにより反応性を高め、またウェル間のバラつきを小さくすることができます。

a.一次抗体液の調製

「③一次抗体粉末」に「②一次反応液」（15mL）のうちの 6ml を加えて溶解する。

補足
・かるく振り混ぜるか、ピペットを利用し、液中で吸入・排出を 2～3 回繰り返して混合してください。

b.一次抗原抗体反応[※14]

96 穴 PP プレートＵ底の各 well を使用し、(4) 3),4)及び 5) で調製した標準溶液、試料希釈溶液、濃度既知の参照試料（Ref.M）及び濃度 0 ブランク（100%DMSO 溶液）を 50μL/well 添加し、次に、「②一次反応液」150μL/well を添加し、数回のピペッティング操作により撹拌し、25%DMSO 溶液を作製する。次に、a. で調製した「一次抗体液」50μL/well を各 well に添加し数回のピペッティング操作により撹拌する。調製した 20%DMSO の試料溶液 100μL を「①PCB 抗原固相化マイクロプレート」の各 well (n=2) に分注し、液面が水平になるように端を軽く叩く。「⑨プレートシール」を貼り、室温（18～25℃）で 60 分間反応させる。

※１４　反応時間及び反応温度は所定の条件で必ず行うこと。

補足
・「①PCB 抗原固相化マイクロプレート」に最初から直接各溶液を添加していくのではなく、別途 96 穴 PP プレートＵ底で事前に混合溶液を作製します。
・8 連マルチチャンネルピペット等を用いて、操作時間を短縮してください。
・反応中はマイクロプレートを静置してください。
・液面が水平になるように端を軽くたたいてください。
・泡立ちやすいので、分注の際は気泡が入らないようゆっくりと操作してください。
・23℃の保持が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。

各試料溶液のマイクロプレートへの分注（配置）例を図２に示す。マイクロプレートの全 Well を使用しなくとも、参照試料（Ref.M）を必ず入れること。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	試料 1−#1	試料 1−#2	試料 9−#1	試料 9−#2	試料 17−#1	試料 17−#2	試料 25−#1	試料 25−#2	試料 33−#1	試料 33−#2
B	Ref.M− #1	Ref.M− #2	試料 2−#1	試料 2−#2	試料 10−#1	試料 10−#2	試料 18−#1	試料 18−#2	試料 26−#1	試料 26−#2	試料 34−#1	試料 34−#2
C	STD 6−#1	STD 6−#2	試料 3−#1	試料 3−#2	試料 11−#1	試料 11−#2	試料 19−#1	試料 19−#2	試料 27−#1	試料 27−#2	試料 35−#1	試料 35−#2
D	STD 5−#1	STD 5−#2	試料 4−#1	試料 4−#2	試料 12−#1	試料 12−#2	試料 20−#1	試料 20−#2	試料 28−#1	試料 28−#2	試料 36−#1	試料 36−#2
E	STD 4−#1	STD 4−#2	試料 5−#1	試料 5−#2	試料 13−#1	試料 13−#2	試料 21−#1	試料 21−#2	試料 29−#1	試料 29−#2	試料 37−#1	試料 37−#2
F	STD 3−#1	STD 3−#2	試料 6−#1	試料 6−#2	試料 14−#1	試料 14−#2	試料 22−#1	試料 22−#2	試料 30−#1	試料 30−#2	試料 38−#1	試料 38−#2
G	STD 2−#1	STD 2−#2	試料 7−#1	試料 7−#2	試料 15−#1	試料 15−#2	試料 23−#1	試料 23−#2	試料 31−#1	試料 31−#2	試料 39−#1	試料 39−#2
H	STD 1−#1	STD 1−#2	試料 8−#1	試料 8−#2	試料 16−#1	試料 16−#2	試料 24−#1	試料 24−#2	試料 32−#1	試料 32−#2	試料 40−#1	試料 40−#2

図２　96well マイクロプレート上での試料の配置例（n=2）

c.未反応物の除去

一次抗原抗体反応終了後、反応液を廃棄する。「洗浄液」300μL/well 入れて廃棄する操作を 3 回繰り返し、各ウェルを洗浄する。洗浄後、ペーパータオル上で「①PCB 抗原固相化マイクロプレート」をタッピング（軽く叩く）し、洗浄液を完全に除去する。

補足
・「洗浄液」はマイクロプレートの前洗浄時に調整しておいたものを使います。
・廃棄した反応液や洗浄液中の PCB 類等は、法令に従って適正に処理下さい。
・測定誤差の原因になりますので、とくに 3 回目の洗浄後は well の底に洗浄液が残っていないことを確認してください。
・マイクロプレートの裏面に水滴やゴミなどが付着している時は拭き取ってください。

d.標識二次抗体液の調製

一次抗原抗体反応時間中に、「④標識二次抗体粉末」に、「⑤粉末抗体溶解液」を全量（14ml）加えて溶解する。

e.二次抗原抗体反応※14）

洗浄した「①PCB 抗原固相化マイクロプレート」に d.で調製した「標識二次抗体液」100μL/well を添加し、液面が水平になるように端を軽く叩く。「⑨プレートシール」を再び

表面に貼り、室温（18～25℃）で 60 分間反応させる。

※１４　反応時間及び反応温度は所定の条件で必ず行うこと。

補足
・反応中はマイクロプレートを静置してください。
・液面が水平になるように端を軽くたたいてください。
・異物混入および蒸発防止のため、反応中はプレートシールでマイクロプレート上面を覆ってください。
・23℃の保持が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。

f.未反応物の除去

二次抗原抗体反応終了後、反応液を廃棄する。「洗浄液」300μL/well を入れて廃棄する操作を 4 回繰り返し、各ウェルを洗浄する。洗浄後、ペーパータオル上で「①PCB 抗原固相化マイクロプレート」をタッピング（軽く叩く）し、洗浄液を完全に除去する。

補足
・「洗浄液」はマイクロプレートの前洗浄時に調整しておいたものを使います。
・測定誤差の原因になりますので、4 回目の洗浄後は well の底に洗浄液が残っていないことを確認してください。
・プレート裏面の汚れは吸光度の測定誤差の原因になりますので、触れないように注意してください。
・マイクロプレートの裏面に水滴やゴミなどが付着している時は拭き取ってください。

g.発色反応[※１４), ※１５)]

洗浄した「①PCB 抗原固相化マイクロプレート」に「⑦発色液」を 100μL/well 添加し、液面が水平になるように端を軽く叩く。「⑨プレートシール」を再び表面に貼り、室温（18～25℃）で 30 分間反応させた後、「⑧発色停止液」を 100μL/well 添加する。

※１４　反応時間及び反応温度は所定の条件で必ず行うこと。

※１５　発色反応の際に異常発色が認められる場合は、二次抗体による非特異反応が考えられる。PCB抗原固相マイクロプレートの洗浄条件を再検討し、ウェル内の二次抗体が十分除去できる洗浄条件に設定すること

補足
・反応中はマイクロプレートを静置してください。
・23℃の保持が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。
・特に検体数が多い場合は、各検体の発色反応時間が一定になるように注意してください。
・発色試薬を加えると青色に、発色停止液を加えると黄色に呈色します。

h.吸光度測定

「①PCB抗原固相化マイクロプレート」外側の底面に付着した汚れや水分を、柔らかなペーパータオル等できれいに拭き取った後、波長450nm における吸光度をプレートリーダーで測定する[※16]。

※１６　　発色停止液を分注した後は、5 分以内に吸光度を測定することが望ましい。

j.検量線の作成

各濃度に調製した KC400 標準溶液をキットで測定を行い、プレートリーダーにより波長 450nm における吸光度を測定する。標準物質設定濃度及び測定値（B/B_0）から、下記に示す 4-パラメーターの式の各係数（A～D）を算出（4-パラメーター・ソフトウェアを用いてもよい）する。検量線及び 4-パラメーターの式の例を図３に示す。

$$y = \frac{(A - D)}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^{B}} + D$$

ここに、　x ：標準物質の濃度(ng/ml)

y ：測定値（B/B_0：吸光度/濃度0における吸光度）

A ：曲線における上方漸近値

B ：IC_{50}における曲線の傾き

C ：IC_{50} における標準物質の濃度(ng/ml)

D ：曲線における下方漸近値

検量線　式：y=(0.866-0.056)/(1+(x/4.373)^1.064)+0.056

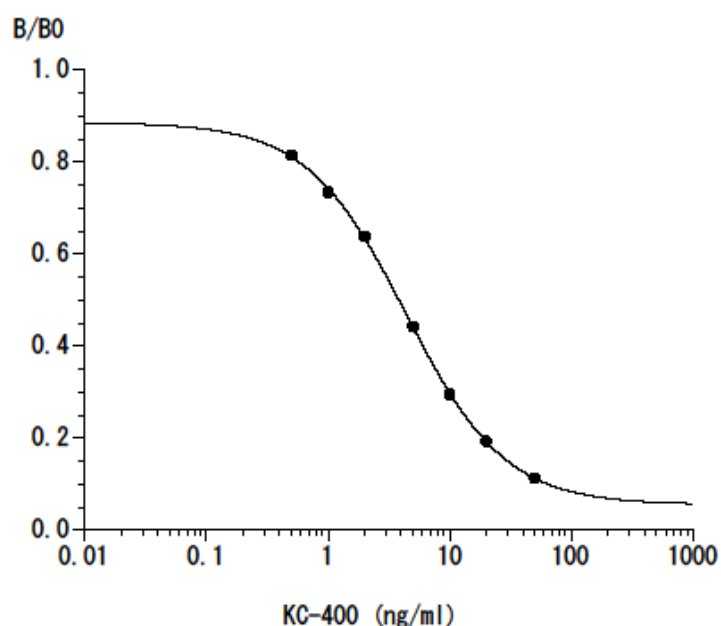



図３ 検量線と 4-パラメーターの式の例

k. 測定試料の定量

各測定試料液から得た測定値（B/B_0 値）を検量線の回帰式に代入し，測定試料液の定量値 *C*（ng/mL）を算出する。B/B_0 値が 0.3 以下の試料については、試料の希釈割合を変え、再測定する。

試料量当りの定量値 *Cs*（ng/g など）は，次の式で求める。濃度は，通常，三けた目を四捨五入し，有効数字は二けたで表す。ただし，検出下限の位までとする。

$$Cs = C \times n \times v \times \frac{1}{s}$$

ここに，　*Cs*：　試料量当りの定量値（ng/g など）
C：　測定試料液の希釈液の定量値（ng/mL）
n：　希釈倍数
v：　前処理試料の液量（μL）
S：　試料の採取量（mg）

2）検出下限及び定量範囲

a.標準溶液の調製

DMSO を用いて KC400 標準物質を希釈し、50、20、10、5、2、1、0.5、0.2ng/mL 濃度になるようにそれぞれガラスバイアルに調製する。

b.標準物質における検出下限及び定量範囲の確認

調製した 8 種類の標準溶液を用い、各濃度 5 回以上の測定を行い、検量線を作成する。JIS K0461「競合免疫測定方法通則」および JIS K0464「ポリクロロビフェニル（PCB）の免疫測定方法通則」において規定されている精度プロファイル（分析値の変動係数を測定対象成分の濃度に対してプロットした図）を作成し、JIS で定義されている検出下限値・定量下限値・定量上限値を求める。

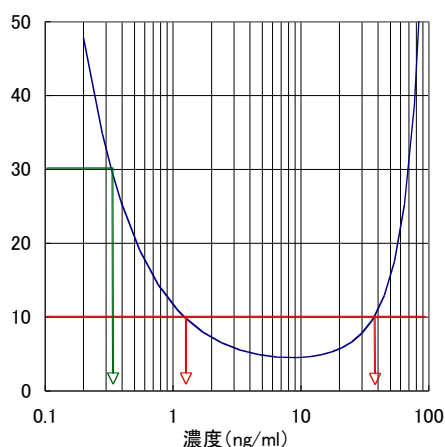



図４　精度プロファイルの例

上記方法により算出したキットの検出下限及び定量範囲の例を表-１に示す。

表-1　標準物質における検出下限及び定量範囲の例

検出下限値	定量下限値	定量上限値
定量値の精度プロファイルにおいて、定量値のCVが30%を示す最小濃度	定量値の精度プロファイルにおいて、定量値のCVが10%を示す最小濃度	定量値の精度プロファイルにおいて、定量値のCVが10%を示す最大濃度
KC-400 0.33ng/mL	KC-400 1.22ng/mL	KC-400 37.3ng/mL
絶縁油25mgを前処理し、250μL溶液として調製された測定試料を10倍希釈して測定した場合 0.33/((25/250)/10)) = 33ng/g = 0.033mg/kg	絶縁油25mgを前処理し、250μL溶液として調製された測定試料を10倍希釈して測定した場合 1.22/((25/250)/10)) = 122ng/g = 0.122mg/kg	絶縁油25mgを前処理し、250μL溶液として調製された測定試料を10倍希釈して測定した場合 37.3/((25/250)/10)) = 3730ng/g = 3.73mg/kg

3)　結果の報告及び評価

a. 濃度の単位　実測値（定量値）は絶縁油重量当たりの KC-400 相当量（ng/g）で表示する。

b. PCB 濃度(mg/kg)への換算

絶縁油中の PCB 量は、試料量当たりの定量値（Cs）と換算係数から以下に示す式で求め、mg/kg として表示する。

なお、0.3mg/kg 以下の試料については、陰性判定試料（ND 試料）と表記する。

絶縁油中 PCB 濃度(mg/kg) = Cs(ng/g)／ 換算係数 ／1000

c. 数値の取り扱い　濃度の表示における取り扱いは、次による。

・濃度については、JIS Z8401 によって数値を丸め、有効数字を２桁として表し、検出下限値未満の場合には検出下限値未満であったことを表示する。但し、試料における検出下限値の桁までとし、それより下の桁は表示しない。

・定量下限値については、JIS Z8401 によって数値を丸め、有効数字を２桁として表示する。

d. データの取りまとめ

・定量範囲内の試料について、２つの測定値のばらつきが（CV%）が 20%以内のものについては、平均値を試料の PCB 濃度とする。20%を超えるものについては、再測定とす

る。

・定量下限値未満の試料については、定量下限値と共に、定量下限値未満と表記する。

・定量上限値を超えるものについては、定量上限値と共に、定量上限値を超えると表記する。

(6) 留意事項

1）日常精度管理

a.一般

試料の前処理の精度及び測定の精度を確保していることの確認を行うため、測定試料数に応じ適切な頻度で、JIS K0464「ポリクロロビフェニル（PCB）の免疫測定方法通則」において規定されている管理を行う。

b.管理図

検量線作成用標準溶液及び濃度既知の参照試料の測定値については、測定操作ごとに JIS Z 9021 に規定した管理図に測定値を記録し保存する。

検量線の確認と感度変動の管理図では、検量線における IC_{50}(B/B_0 で 50%)付近の吸光度から、4-パラメーターの式を用いて標準物質濃度を算出した数値を記録する。
管理図による処置基準は，管理限界（$\mu\pm3\sigma$）からの逸脱状況及び管理図の傾向に応じて適切に定める（μ:工程平均，σ:定量値の標準偏差)。1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明及び対策を行うとともに、同一プレート上の全試料を再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について、記録を行う。また、警戒限界（$\mu\pm2\sigma$）内であっても基準値に対して、一定の傾向で外れていくような状態又は偏った定量値が続くような状態においても原因の究明を行い、必要に応じ対策を行うとともに，試料を再測定する。なお、管理限界は、あらかじめ十分なサンプル数から求める。

c.偽陰性防止

陰性判定試料（ND 試料）の 2%（50 検体の陰性判定試料から 1 検体の割合）を簡易測定法若しくは平成４年厚生省告示第 192 号別表第２に定める方法にて測定する。

2）換算係数

JIS K0464「ポリクロロビフェニル（PCB）の免疫測定方法通則」では、定量値は検量線に用いた標準試料量となっている。ELISA においては標準試料を KC400 としていることから、定量値は KC400 相当量で得られる。絶縁油中の PCB 量として求めるには、ダイオキシン生物検定法マニュアルで示されているように、標準試料量（KC400 相当量）と機器分析値との相関から求めた換算係数により換算して PCB 量を算出する。

図５に示すように、ELISA で得られた定量値と機器分析値との相関から、換算係数を求める（この場合、換算係数は 0.789)。

しかしながら、相関から求めた換算係数をそのまま用いた場合、他の PCB 製品（KC300, KC600 等）の PCB 量が低く換算される場合が生じるため、本迅速判定法においては、値が低くなる既知濃度試料を測定し、低くなる度合いを補正した換算係数（40%程度値が低くなる場合、補正した換算係数は　0.789 x 0.6 = 0.473 となる）を全ての試料に対して用いて

PCB 量に変換することとする。

測定条件が変わる場合（機器、試薬、キットのロット等）に、反応性の低い既知濃度試料を測定し換算係数を見直す。

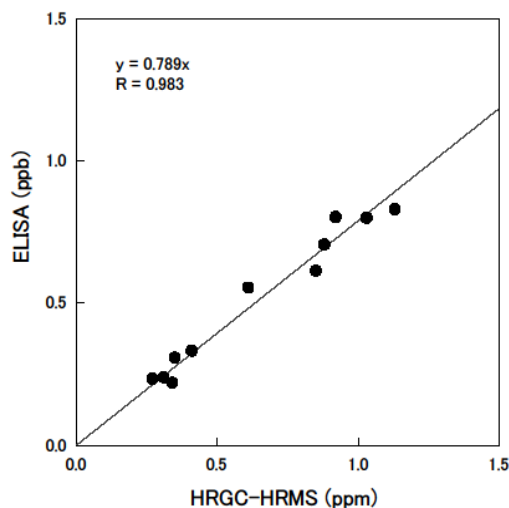



図５　換算係数作成の例

手順解説：換算係数 ・本品における環境省マニュアル対応の換算係数は、本文中でも「補正した換算係数」として記載されている「0.473」となります。エビデンスに関するデータファイルはご希望の方へ別途ご提供します。

3）留意事項

※1　酵素免疫測定キットとしての市販品がある。

内容物は、以下の通りである。

a) PCB抗原固相化マイクロプレート 96well 1枚

b）一次反応液 15ml 1本

c) PCB一次抗体粉末 6ml用 1本

d) PCB標識二次抗体粉末 14ml用 1本

e) PCB二次抗体溶解液 14ml

f) 20倍濃縮洗浄液 50ml

g）発色液 15ml

h）発色停止液 15ml

i）プレートシール 1枚

j）使用説明書 1部

※2　芳香族系化合物が主体の絶縁油（JIS2 種，４種，５種，DOP）以外の JIS1 種，JIS3 種，JIS6 種，JIS7 種の試料では約 100mg まで増量することも可能である。

※３　秤量に用いる天秤は、0.1 ㎎まで測定できるものを使用すること。

※４　加熱多層シリカゲルカラム/アルミナカラムを前処理に用いる簡易定量法において使用されるクリーンアップスパイクを添加することは可能である。

※５　前処理後の多層シリカゲルカラムについては、測定データの信頼性が確認されるまで現物保存もしくは写真を撮り保存すること。試料の精製度の確認は、試料の精製度確認のための測定を行い判断することができる。精製度が不十分である場合、使用した多層シリカゲルカラムの着色状態などから原因を明らかにした上で試料を減量する等して前処理をやり直す。

※６　多層シリカゲルカラムに移し入れる溶液及び洗浄液量は合計でほぼ 1 mL とする。この液量以下あるいは以上であると精製効率が低下することがある。

※７　この部分以外を加熱すると精製効率が低下及び PCB の回収率が低下することがある。

※８　加熱温度は 60 から 90 ℃の範囲で、加熱時間は任意の範囲で変化させても良いが、85 ℃にて 60 分間加熱する場合と同等の精製効果が得られること。

※９　ヘキサンの液量を変化させても良いが、PCB の回収率が確保されることを確認すること。

※１０　着色した部分が片寄ったりしているなど、カラムクロマトの展開が乱れている場合は、やり直すこと。

※１１　加熱温度を変化させても良いが、PCB の回収率が確保されることを確認すること。

※１２　DMSO の液量を変化させても良いが、PCB の回収率と測定における感度が確保されることを確認すること。

※１３　DMSO の代わりにトルエン 600μl を用いても構わない。その場合、溶出したトルエンの一定量を DMSO に転溶して測定液とすること。

※１４　反応時間及び反応温度は所定の条件で必ず行うこと。

※１５　発色反応の際に異常発色が認められる場合は、二次抗体による非特異反応が考えられる。PCB抗原固相マイクロプレートの洗浄条件を再検討し、ウェル内の二次抗体が十分除去できる洗浄条件に設定すること

※１６　発色停止液を分注した後は、5 分以内に吸光度を測定することが望ましい。